

## 大腸菌 *zinT* (*yodA*) タンパク質の Lipocalin 機能

青木 拓<sup>1</sup>、武智 佳代、後河内(前村) 知美<sup>2</sup>、半野 由依子<sup>2</sup>、酒井 勇太<sup>2</sup>、  
伊藤 寛人<sup>2</sup>、広瀬(柴垣) 明佳<sup>1</sup>、佐藤 高則<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> 徳島大学大学院人間・自然環境研究科、<sup>2</sup> 徳島大学総合科学部自然システム学科、  
<sup>3</sup> 徳島大学大学院ソシオ・アート・アンド・サイエンス研究部  
770-8502 徳島市南常三島町 1-1

### Lipocalin function of *E.coli zinT* (*yodA*) protein.

Taku AOKI<sup>1</sup>, Kayo TAKECHI<sup>2</sup>, Tomomi MAEMURA-USHIROGOCHI<sup>2</sup>, Yuiko HANNO<sup>2</sup>, Hayata SAKAI<sup>2</sup>, Hiroto ITOH<sup>2</sup>, Haruka SHIBAGAKI-HIROSE<sup>1</sup>, and Takanori SATOH<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biochemistry, Graduate school of Human and Natural Environment Sciences, The University of Tokushima, <sup>2</sup> Laboratory of Biochemistry, Faculty of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, <sup>3</sup> Institute of Socio-Arts and Sciences, The University of Tokushima, Tokushima city, Tokushima 770-8502, Japan  
\*To whom correspondence should be addressed. e-mail: tsatoh@tokushima-u.ac.jp

#### ABSTRACT

重金属やアミトロール(AT)で発現誘導され、大腸菌ストレス応答タンパク質の一種である *zinT* (*yodA*)は、一次構造比較や X 線結晶構造解析による三次元立体構造などから、C 末端領域に金属結合部位を持つこと、ABC transporter や lipocalin ファミリーと一部相同なアミノ酸配列を持つことが明らかとなっているが、*zinT* の金属以外の低分子結合能については報告がない。そこで本研究では、大腸菌 *zinT* タンパク質の種々の物質との結合能を、野生型 *zinT* および N 末端 22 残基欠損体( $\Delta$ N22)を用いて検討した。

まず、*zinT* の分子内 Tyr または Trp 蛍光を指標として、種々の物質を添加に伴う蛍光強度の減少を測定した。低分子化合物としては、(1)AT および dNTP (2) 脂肪酸および脂質 5 種、(3) 複素式化合物 3 種、(4)芳香族化合物 3 種を検討し、*zinT* に対しそれぞれ添加し、30°C、10 分間保温後、蛍光スペクトルを測定した。その結果、化合物添加により *zinT* の最大蛍光強度は濃度依存的に減少し、特に dNTP, Quercetin および 8-ANS で顕著に見られた。また、野生型と  $\Delta$ N22 において、蛍光減少の濃度依存性に顕著な差異は見られなかった。以上より、*zinT* は疎水性低分子化合物結合能(lipocalin 活性)を有し、N 末端領域の lipocalin 活性に対する寄与は少ないことが明らかとなった。

**Keywords:** Lipocalin, *zinT*, Stress response, Fluorescence spectra, Binding properties, Small hydrophobic molecule

#### 1. 緒言

種々の細菌は、その生育環境に適応し、環境ストレスに対する応答機構(環境ストレス応答)を有しており、関与する遺伝子・タンパク質群の解明が進んでいる。本研究対象である *E.coli zinT* タンパク質は以前は *yodA* と呼ばれ、大腸菌のカド

ミウムストレスで発現が誘導されるタンパク質として見いだされた<sup>1)</sup>。この条件下における *zinT* の転写レベルは、*OxyR* には依存せず *SoxS* と *Fur* に依存し、また緊縮応答の関与は低く、大腸菌のカドミウム応答は  $O_2^-$  による酸化ストレス応答の経路に類似していると報告されている<sup>2)</sup>。その後、Cd,Zn,Ni と結合した *zinT* の三次元立体構造

(PDB code: 1OEE, 1OEJ, 1OEK)が報告され、これらの金属結合部位が明らかとなった<sup>3)</sup>。一方では *zinT* が Cd と結合することで大腸菌が Cd ストレスを緩和していることや<sup>4)</sup>、*zinT* の重金属結合の質量分析の結果により、*zinT* は Ni, Zn, Cd, Hg に結合するタンパク質であることが報告されている<sup>5)</sup>。

一方、環境ホルモンの一種であるアミトロール (AT)<sup>6)</sup>は現在、塗料や写真薬品、樹脂の硬化剤として使用され、過去には農薬としても使用されていた。この物質は水に対する溶解度が非常に高く、細菌への成長阻害効果を示すことが知られている<sup>7)</sup>。大腸菌やサルモネラ菌では遺伝子変異剤で処理すると、AT 存在下でも生育可能な AT 抵抗性を示す変異株が出現することが報告されている<sup>8,9)</sup>。過去の研究より我々は、AT 抵抗性を示す大腸菌を遺伝子変異剤を用いて作製し、その発現タンパク質を調べたところ、AT 抵抗性大腸菌では AT 濃度の上昇に伴い、発現量の増加するタンパク質として *zinT* を、発現量の減少するものとして Alkyl hydroperoxide reductase C22 protein (AhpC) をそれぞれ見出した<sup>10)</sup>。このうち、*zinT* は通常の signal peptide の切断位置からさらに 22 残基欠損していた。これより AT 抵抗性大腸菌では、上記の重金属ストレスと同じく O<sub>2</sub><sup>-</sup>による酸化ストレス応答の経路を取ると推定されている。

以上のように、大腸菌のストレス応答に *zinT*

が深く関与しており、*zinT* タンパク質の主な機能は重金属結合レセプターとして考えられている。しかしながら、この *zinT* は一次構造および立体構造上の比較から calycin superfamily の疎水性低分子に結合する lipocalin/calycin family や ABC transporter の金属結合レセプターとも相同性が見られる<sup>3)</sup>。さらに *zinT* は、大腸菌の生育 pH 変化に伴うプロテオーム解析で Dye-ligand に結合するタンパク質として同定されたこと<sup>11)</sup>や、Benzoate 添加により発現が誘導されること<sup>12)</sup>も報告されている。このように *zinT* は lipocalin と類似した機能を持つと推定されるが、金属結合以外の *zinT* の機能に関するタンパク質化学的研究はほとんどない。そこで本研究では、この *E. coli zinT* の蛋白質科学的特性や種々の低分子化合物との結合特性(lipocalin 活性)を検討し、さらに N 末端 22 残基を欠損させた N 末端欠損体を同様に解析することにより、lipocalin 活性への N 末端領域の関与についても検討を行った。

## 2. 実験方法

### *E. coli zinT* 野生型(WT)および N 末端欠損体(ΔN22)発現ベクターの構築

*E. coli zinT* の signal peptide (Ala1-Ser22)を欠損

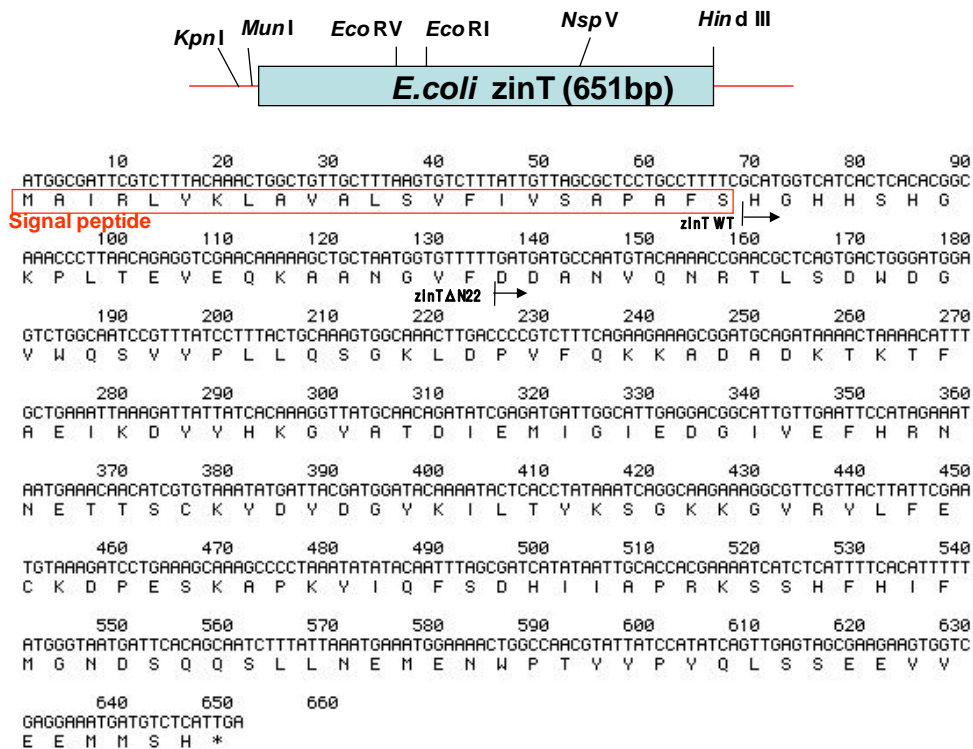


Fig.1 *E. coli zinT* 遺伝子の塩基配列と推定されるアミノ酸配列<sup>10)</sup>

Signal peptide を box で、*zinT* WT と ΔN22 の N 末端領域をバーと矢印で示した。

させた zinT WT、および zinT WT の N 末端 22 残基を欠損させた zinT  $\Delta$ N22 の発現ベクターの構築は、以下の通り行った。まず zinT WT の場合には、*E.coli* zinT 遺伝子(Fig.1)が挿入されたクローニングベクター pUCzinT<sup>10)</sup>を鋳型に、zinTWT upper primer (5'-GACCCAATTGATGCATGGTCATCACTCACA-3', 30mer)と zinTWT lower primer(5'-GCCGGATCCAAGCTTCAATGA-3', 21mer)を用いて PCR を行い、PCR 増幅断片を制限酵素 *Mun* I と *Hin* d III で消化した。この遺伝子断片を pMK2PPAQ の *Eco* RI - *Hin* d III 部位に挿入し、zinT WT 用発現ベクター pMK2zinTWT を構築した。zinT  $\Delta$ N22 の発現ベクターは、pUCzinT を鋳型に zinT  $\Delta$ N22 upper primer (5'-GACCCAATTGATGGATGATGCCAATGTA-3', 28mer)と zinTWT lower primer を用いて PCR を行い、PCR 増幅断片を制限酵素 *Mun* I と *Hin* d III で消化した。この遺伝子断片を pMK2PPAQ の *Eco* RI - *Hin* d III 部位に挿入し、zinT  $\Delta$ N22 の発現ベクター pMK2zinT  $\Delta$ N22 を構築した。PCR のアニーリング温度は、いずれの場合も 57°C で行った。また、構築した各発現ベクターは、DNA 塩基配列決定を行い、目的の塩基配列を有することを確認した。

### *E.coli* zinT WT および $\Delta$ N22 の精製

野生型 zinT (zinT WT)および zinT  $\Delta$ N22 の精製は、下記のように行った。各 zinT の発現ベクターにより大腸菌 JM109 株を形質転換し、得られた形質転換体を LB/Amp 培地にて大量培養を行った。培養液を遠心分離により集菌し、超音波による菌体破碎を行った後、上清を回収し粗抽出液とした。これを 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を用いた DEAE-Cellulose(和光純薬)イオン交換クロマトグラフィーおよび Sephacryl S200-HR (GEヘルスケア)ゲルろ過クロマトグラフィーのカラム操作を経て、電気泳動的に単一な精製標品を得た。

## 分光学的解析

### 1. 蛍光スペクトル

蛍光スペクトルの測定は、Hitachi F-2500 蛍光分光光度計により測定を行った。測定は 1cm 四面透過石英セルを用い、試料 600 $\mu$ L を用いて室温で行った。Tyr 蛍光スペクトルは励起波長 275nm、蛍光測定波長は 300-400nm に、Trp 蛍光スペクトルは励起波長 295nm、蛍光測定波長は 320-400nm に設定し、各々測定を行った。

### 2.ヌクレオチド、アミトロール(AT)、イミダゾール結合実験

ヌクレオチド結合性タンパク質の分子内部に存在する Tyr 残基を指標として、ヌクレオチド存在下で蛍光スペクトルを測定すると、濃度に依存して蛍光強度が減少することが知られている<sup>13)</sup>。そこで、*E.coli* zinT のヌクレオチド結合性を検討するために、分子内に存在する Tyr 残基(13 残基)を指標として、Tyr 蛍光スペクトルのヌクレオチド添加に伴うスペクトル変化を検討した。

ヌクレオチド結合実験は、Okajima らの報告を参考に行った<sup>13)</sup>。測定試料の濃度を 0.05mg/mL(2.5 $\mu$ M)に設定し、10mM の dNTP (N=A,T,G,C,U) を終濃度 0-1.0mM になるように添加し、37°C で 10 分間保温した後、Ex.275nm における蛍光スペクトルを測定した。ヌクレオチド非存在下における最大蛍光強度を 100%として、各濃度における最大蛍光強度から消光率 Q(%)を算出した。

$$Q(\%) = F_{\text{max,dNTP}} / F_{\text{max,solvent}} \times 100 \quad (1)$$

また過去の研究により、zinT が AT 抵抗性大腸菌において発現が増加していたため<sup>10)</sup>、zinT の AT 結合性についても検討した。AT 結合実験は、測定試料の濃度を 0.05mg/mL(2.5 $\mu$ M)に設定し、100mg/mL AT を終濃度 0-1.0 mg/mL (0-11.9mM) になるように試料に添加し、37°C で 10 分間保温した後、励起波長 275nm における蛍光スペクトルを測定した。また対照として、イミダゾールについても上記の条件で励起波長 275nm にて蛍光スペクトル測定を行った。AT またはイミダゾール非存在下における最大蛍光強度を 100%として、上記(1)式より消光率 Q(%)を算出した。

### 3. 疎水性低分子結合実験(lipocalin 活性)

Calycin/Lipocalin family に属するタンパク質は、疎水性低分子に結合することが知られている。そこで他の lipocalin の報告<sup>14-19)</sup>を参考にして、*E.coli* zinT の種々の疎水性低分子との結合能について以下のように検討した。

脂肪酸・脂溶性分子としては、飽和脂肪酸のミリスチン酸(C14:0)、パルミチン酸(C16:0)、ステアリン酸を、不飽和脂肪酸のパルミトレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)を、脂溶性分子としてレチノールの 7 種を使用した<sup>14-18)</sup>。これらの試薬をメタノールに溶解し、10mM stock solution を調製した。これらの stock solution を 20 分間、37°C で保温し、zinT タンパク質(0.02mg/mL, 1 $\mu$ M)に終濃度 30 $\mu$ M(メタノール終濃度 0.3% (v/v))になるように添加した。これを 37°C、10 分間保温し、励起波長 295nm で蛍光スペクトル測定を行った。測定データは、20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)に同様に各 stock solution を添加した試料 (Blank) の測定データを差し引

き算出した。また、zinT タンパク質に終濃度 0.3% (v/v)メタノールになるように添加した試料の蛍光スペクトルの最大蛍光強度を 100%として、上記(1)式より消光率  $Q(\%)$ を算出した。

複素式化合物としては、アンピシリン<sup>14)</sup>、ピタミン B1(チアミン塩酸塩)、ケルセチン<sup>20,21)</sup>の3種を使用した。ケルセチンはメタノールに、他の2種は 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)にそれぞれ溶解し、10mM stock solution を調製した。これらの stock solution を 20 分間、37℃で保温し、zinT タンパク質(0.02mg/mL, 1μM)に終濃度 30μM(ケルセチン場合はメタノール終濃度 0.3% (v/v))になるように添加した。これを 37℃、10 分間保温し、励起波長 295nm で蛍光スペクトル測定を行った。測定データは、20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)に同様に各 stock solution を添加した試料 (Blank) の測定データを差し引き算出した。また、zinT タンパク質に buffer または終濃度 0.3% (v/v)メタノール (ケルセチンのみ) を添加した試料の蛍光スペクトルの最大蛍光強度を 100%として、上記(1)式より消光率  $Q(\%)$ を算出した。

芳香族化合物としては、1-ナフトール、8-ANS(8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid)<sup>17)</sup>、1-AMA(1-aminoanthracene)<sup>19)</sup>の3種を使用した。1-ナフトール、1-AMA の試薬はメタノールに、8-ANS は 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)にそれぞれ溶解し、10mM stock solution を調製した。これらの stock solution を 20 分間、37℃で保温し、zinT (0.02mg/mL, 1μM)に終濃度 30μM(1-ナフトール、1-AMA はメタノール終濃度 0.3% (v/v))になるように添加した。これを 37℃、10 分間保温し、励起波長 295nm で蛍光スペクトル測定を行った。測定データは、20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)に同様に各 stock solution を添加した試料 (Blank) の測定データを差し引き算出した。また、zinT に buffer (8-ANS) または終濃度 0.3% (v/v)メタノール(1-ナフトール、1-AMA)になるように添加した試料の蛍光スペクトルの最大蛍光強度を 100%として、上記(1)式より消光率  $Q(\%)$ を算出した。

さらに、相対蛍光強度  $Q$  の低下した試薬に対しては、試薬の結合濃度依存性を検討した。1-AMA、1-ナフトール、レチノール、ケルセチンをメタノールに、8-ANS は 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)にそれぞれ溶解し、10mM stock solution を調製した。これらの stock solution を 20 分間、37℃で保温し、zinT (0.02mg/mL, 1μM)に終濃度 0-100μM(メタノール終濃度: 0-1.0% (v/v))になるように添加した。これを 37℃、10 分間保温し、励起波長 295nm で蛍光スペクトル測定を行った。測定データは、20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)に同様に各 stock solution を添加した試料 (Blank) の測定データを差し引き算出した。また、zinT タンパク質に終濃度 0-1.0% (v/v)メタノールになるように添加した試料の蛍光スペクトルの最大蛍光

強度 100%として、上記(1)式より消光率  $Q(\%)$ を算出した。zinT タンパク質の各試薬に対する結合定数  $K_d$ は、相対蛍光強度  $Q$  が 50%のときの ligand 濃度(μM)として求めた。

#### 4. 蛍光消光法による zinT の立体構造変化解析

タンパク質の立体構造変化を追跡する方法として、分子内の Trp や Tyr 残基の蛍光変化を測定する方法とともに、広く用いられるのが KI やアクリルアミドなどの消光剤を用いた蛍光消光法である。これは、タンパク質変性や変異導入などによる立体構造変化を、Trp 残基を指標として消光剤との反応性を検討する方法である。分子内 Trp 残基が溶媒中にどの程度露出しているかは、消光剤による消光作用の強さを調べることにより、検出することができる<sup>22,23)</sup>。この方法を zinT に対して適用した。

タンパク質濃度 0.02mg/mL の試料溶液に 20mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)、6M ヨウ化カリウムを加え、タンパク質終濃度 5μg/mL、消光剤であるヨウ化カリウムを終濃度 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6M の各濃度になるように調整し、蛍光スペクトルを測定した。このとき 6M ヨウ化カリウムには  $I_3^-$  の形成を阻害するために 0.1mM のチオシアン酸ナトリウムを加えた<sup>22)</sup>。消光剤存在下および非存在下の蛍光強度と、消光剤濃度は関係があり、それにより直線を求め Stern-Volmer 式 (2) を求め、そこから直線の傾きである Stern-Volmer 定数( $K_q$ )を求めた<sup>23)</sup>。

$$F_0/F = 1 + K_q [Q] \quad (2)$$

このとき  $F_0$ : 消光剤非存在下の最大蛍光強度、 $F$ : 消光剤存在下の最大蛍光強度、 $[Q]$ : 消光剤濃度、 $K_q$ : Stern-Volmer 定数を表す。

#### 5. 8-ANS を用いた zinT の疎水性領域露出の解析<sup>24)</sup>

8-ANS は溶液中で 515nm 付近に蛍光極大を示すが、タンパク質の疎水性領域に 8-ANS が結合すると、蛍光強度の増大と蛍光極大波長の短波長側へのブルーシフトが見られる。この方法を、zinT に対して適用した。タンパク質濃度 0.05mg/mL に調製した各試料に、1mM ANS を終濃度 40μM になるように添加し(試料 576ul+1mM ANS 24ul)、Hitachi F-2500 蛍光分光光度計により、ANS の蛍光スペクトル測定を行った。その際、励起波長は 390nm、蛍光測定波長は 400-700nm とし、1cm 四面透過石英セルを用い室温で行った。各データは、20mM Tris-HCl (pH 8.0)に終濃度 40μM ANS を添加した対照溶液の蛍光スペクトルを差し引いて、補正データとした。



### 3. 実験結果

#### 野生型 *E.coli* *zinT* WT および N 末端 22 残基欠損体 ( $\Delta$ N22) の発現系の構築

*E.coli zinT*(*yodA*)タンパク質はカドミウムストレスに対する応答タンパク質として見いだされ<sup>1)</sup>、三次元立体構造や金属結合部位が同定された<sup>3)</sup>。一方、過去の研究により、環境ホルモンの一種であるアミトロール(AT)抵抗性大腸菌で、AT 濃度の増加に伴い発現量の増加するタンパク質として、*zinT* タンパク質が同定された<sup>10)</sup>。この *zinT* は一次構造および立体構造上の比較から疎水性低分子に結合する lipocalin family に類似しており、さらに ABC transporter の金属結合レセプターとも相同性が見られる<sup>3)</sup>。しかしながら、金属結合以外の *zinT* の機能に関するタンパク質化学的研究はほとんどない。そこで本研究では、この *E.coli zinT* の種々の低分子化合物との結合特性を検討することを目的として、まず *E.coli zinT* タンパク質の大量発現系の構築を行った。

まず上記実験方法に示した通り、signal peptide を欠損させた野生型 *zinT*(*zinT* WT)発現ベクターである pMK2*zinT*WT の構築を行った。一方、*zinT* の N 末端 22 残基を欠損させた *zinT*  $\Delta$ N22 についても、上記の実験方法に従い、発現ベクター pMK2*zinT*  $\Delta$ N22 を構築した。両者とも DNA 塩基配列決定により目的の塩基配列であることを確認した。

構築した pMK2*zinT*WT および pMK2*zinT*  $\Delta$ N22 の発現ベクターにより大腸菌 JM109 株を形質転換し、形質転換体を LB/Amp 培地にて培養し、集

菌後、Bugbuster (Novagen)により溶菌し、遠心分離により上清(sup.)と沈殿(ppt.)に分離した。各々を 15% gel を用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、および 10% gel を用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動(Native-PAGE)により分析し、菌体可溶性画分に *zinT* タンパク質の発現が示唆された (Fig.2)。また SDS-PAGE のゲルを PVDF 膜に転写し、*zinT* WT のバンドの N 末端分析を行なったところ、推定される WT の N 末端アミノ酸配列 ( $H^1GHHS^5$ )が検出された (data not shown)。これより菌体可溶性画分に各 *zinT* タンパク質の発現が確認されたため、各発現ベクターで形質転換した大腸菌を大量培養し、*zinT* WT および *zinT*  $\Delta$ N22 の精製を行った。大量培養、粗抽出液の調製、DEAE-Cellulose イオン交換クロマトグラフィーおよび Sephacryl S-200HR ゲルろ過クロマトグラフィーを行い、電気泳動的に単一な精製標品を得た。

#### *E.coli zinT* WT および $\Delta$ N22 の立体構造の相違の検討

精製した *E.coli zinT* WT (以下 WT と略記) および *zinT*  $\Delta$ N22 (以下  $\Delta$ N22 と略記) について、立体構造上の相違に関する知見を得るために、分子内 Tyr および Trp 残基の蛍光スペクトル、消光剤(KI)を用いた蛍光消光実験、8-ANS を用いた *zinT* の疎水性領域露出の差異の検討を行った。

WT には、分子内に Trp が 3 残基 (Trp35,39,173)、Tyr が 13 残基 (Tyr43,73,74,78,105, 107,110,115,124, 138,176,177,179)存在する<sup>12)</sup>。これらの芳香族アミノ酸を内在性蛍光プローブとして、WT と  $\Delta$ N22 の蛍光スペクトルを測定し、両者の三次構造の相違を検討した (Table I)。これより、 $\Delta$ N22 は WT に比べ、Tyr, Trp 蛍光スペクトルとも蛍光強度の増大が見られた。これより  $\Delta$ N22 は 22 残基欠損により芳香族残基の励起が生じやすくなっていることが示唆された。

次に WT と  $\Delta$ N22 の Trp 環境の相違を検討するために、消光剤(KI)による Trp 蛍光の消光実験を行なった。実験方法で述べたように、分子内 Trp 残基が溶媒中にどの程度露出しているかは、消光剤による消光作用の強さを調べることににより、検出することができる。そこで、WT および  $\Delta$ N22 に対して KI を濃度依存的に作用させ、その消光率を検討した (Table I)。これより、 $\Delta$ N22 は WT よりも消光剤 KI に対する反応性( $K_d$ )が高く、上記の蛍光スペクトルの結果と併せ、 $\Delta$ N22 では Trp が WT よりも若干表面に存在していることが示唆された。

さらに、8-ANS を用いた *zinT* の疎水性領域の差異の検討を行った。8-ANS は溶液中で 515nm 付近に蛍光極大を示すが、タンパク質の疎水性領域に 8-ANS が結合すると、蛍光強度の増大と蛍

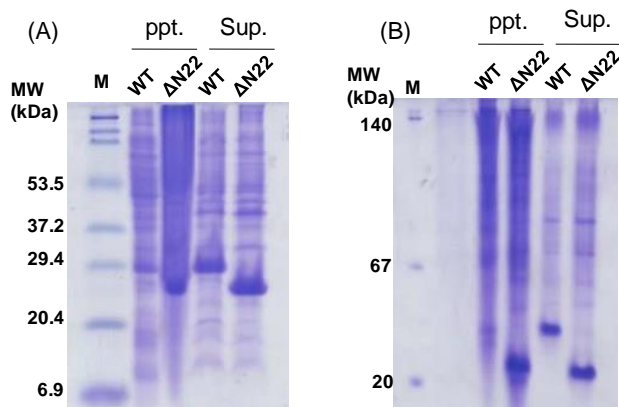


Fig.2 *E.coli zinT* WT および  $\Delta$ N22 の大腸菌による発現

(A) SDS-PAGE (15% gel), (B) Native-PAGE (10% gel). 実験方法の手順に従い粗抽出液を調製し、10 $\mu$ L を各電気泳動を行なった。WT: 野生型 *E.coli zinT*,  $\Delta$ N22: *zinT* N 末端 22 残基欠損体, Sup: 菌体可溶性画分, ppt.: 菌体不溶性画分

**Table I** *zinT* WT および  $\Delta N22$  の Tyr および Trp 環境の検討

	Fluorescence spectra				
	Tyr <sup>(a)</sup>		Trp <sup>(b)</sup>		KI <sup>(c)</sup>
	Fmax	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Fmax	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$K_q(\text{mM}^{-1})$
<i>zinT</i> WT	5380	335	1330	334.5	0.53
<i>zinT</i> $\Delta N22$	9800	336	2840	335.5	0.66

(a) 励起波長 275nm、蛍光測定波長 300-400nm, タンパク質濃度 0.05mg/mL で測定した。(b) 励起波長 295nm、蛍光測定波長 320-400nm, タンパク質濃度 0.05mg/mL で測定した。(c) 励起波長 295nm、蛍光測定波長 320-400nm, タンパク質濃度 0.02mg/mL で測定した。

光極大波長の短波長側へのブルーシフトが見られる。この方法を WT と  $\Delta N22$  に適用し、両者の疎水性領域の露出の差異を検討した(Fig.3)。これより、 $\Delta N22$  は WT よりも ANS との反応性が増し、ANS 蛍光が増大していることが観察された。上記の Tyr, Trp 蛍光スペクトル、KI 消光実験と同様に、欠損により  $\Delta N22$  では分子内疎水性領域が WT よりも表面に存在していることが示唆された。

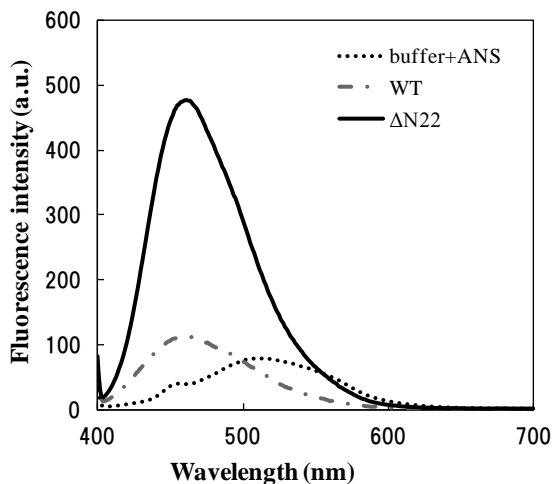
#### *E. coli zinT* WT および $\Delta N22$ の AT およびイミダゾール結合の検討

先に述べたように、*zinT* は AT 抵抗性大腸菌において発現量の増加が示唆されている<sup>10)</sup>。そこで、*zinT* WT および  $\Delta N22$  の Tyr および Trp 蛍光に対

する AT 添加の影響を検討した。さらに、化学構造の類似したイミダゾールについても Tyr 蛍光に対するイミダゾール添加の影響を検討した(Fig.4)。

まず AT はその蛍光特性が不明なため、20mM Tris-HCl buffer (pH8.0)に終濃度 0.3, 0.7, 1.0mg/mL の AT を添加し、励起波長 275nm および 295nm にて蛍光スペクトルを測定した。その結果、AT 自身はこれらの励起波長では蛍光を示さないことが示唆された(data not shown)。そこで、WT および  $\Delta N22$  に AT を添加し、Tyr 蛍光および Trp 蛍光への影響について検討を行った。まず、WT および  $\Delta N22$  の Trp 蛍光では、AT 濃度を上昇させても顕著な蛍光強度の減少は観察されなかった(Fig.4(A))。一方、Tyr 蛍光では、WT、 $\Delta N22$  とも AT 濃度の上昇とともに蛍光強度の減少が観察され、 $\Delta N22$  の方が WT よりも減少量が大きかった(Fig.4(B))。このことから、*zinT* は AT と相互作用する可能性が示唆され、 $\Delta N22$  の方が若干 AT に対する親和性が高いと考えられる。

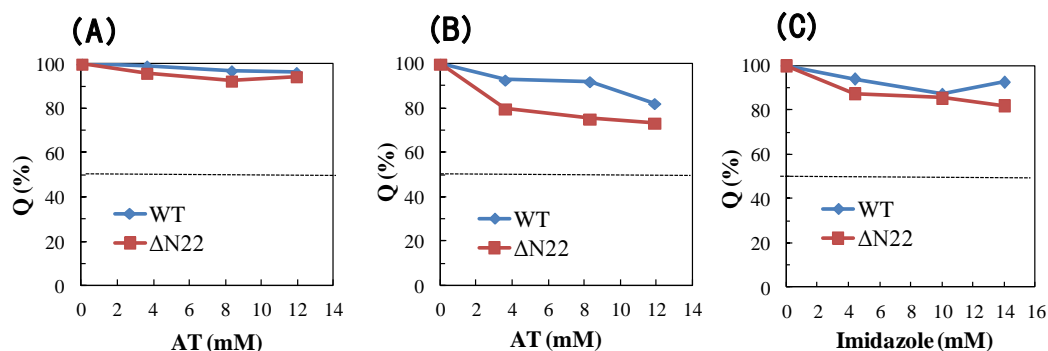
次に AT と化学構造の類似する複素式化合物であるイミダゾールについて、WT および  $\Delta N22$  にイミダゾールを添加し、先の AT で蛍光強度の減少が見られた Tyr 蛍光への影響についてのみ検討を行った(Fig.4(C))。WT、 $\Delta N22$  とも Tyr 蛍光は imidazole 濃度の上昇とともに蛍光強度の減少傾向が見られ、 $\Delta N22$  の方が WT よりも減少量が大きかった。このことから、*zinT* の Tyr 残基は AT と同様に imidazole にも相互作用する可能性が示唆され、 $\Delta N22$  の方が若干 AT、imidazole に対する親和性(Q  $\approx$  80%)が高いと考えられる。

**Fig.3** *zinT* WT および  $\Delta N22$  の ANS 蛍光スペクトル

測定条件は以下の通り行なった。タンパク質濃度:0.05mg/mL、励起波長:390nm、蛍光測定波長:400-700nm、Buffer:20mM Tris-HCl (pH 8.0)、ANS 終濃度: 40 $\mu$ M

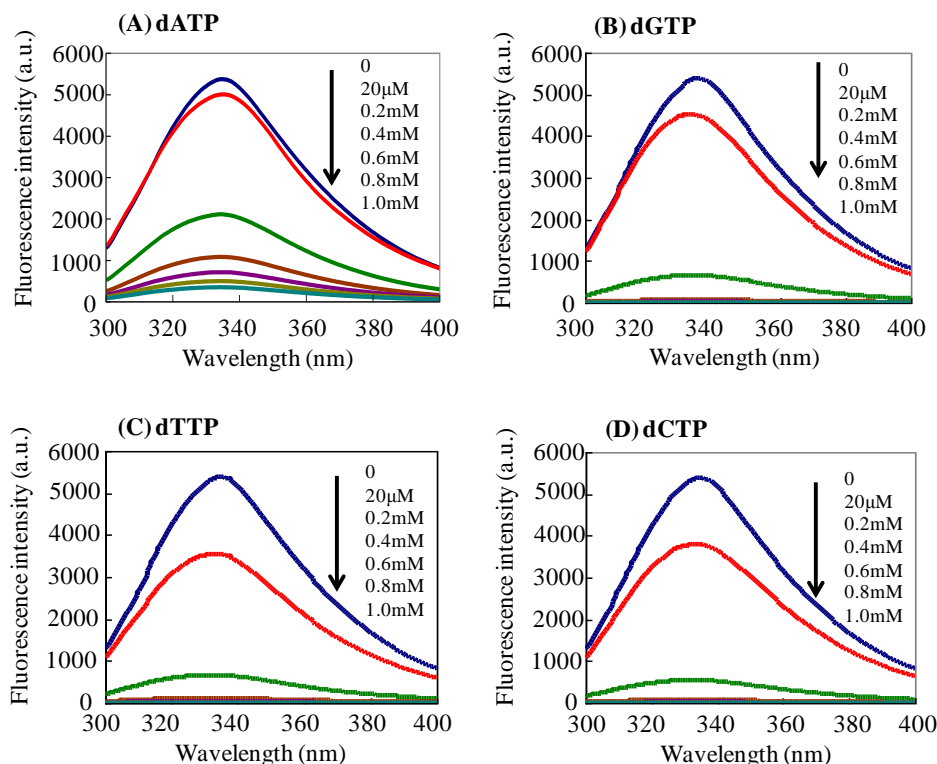
#### *E. coli zinT* WT および $\Delta N22$ の dNTP 結合の検討

*E. coli zinT* の一次構造には、ヌクレオチド結合性タンパク質に見られる Walker motif A (GXXXXGKT/S)<sup>25)</sup> に類似した配列 (G<sup>2</sup>HHSHGKP<sup>9</sup>)が N 末端に見られ、また ABC transporter を構成するレセプターの一部と相同性



**Fig.4** *E.coli* zinT WT および  $\Delta N22$  の蛍光消光率の ATP および imidazole 濃度依存性

(A) zinT の Trp 蛍光消光率の ATP 濃度依存性、(B) zinT の Tyr 蛍光消光率の ATP 濃度依存性、(C) zinT の Tyr 蛍光消光率の imidazole 濃度依存性。測定条件は以下の通り行なった。(A)タンパク質濃度:0.05mg/mL、励起波長:295nm、蛍光測定波長:320-400nm、(B)タンパク質濃度:0.05mg/mL、励起波長:275nm、蛍光測定波長:300-400nm。Buffer はいずれも 20mM Tris-HCl (pH 8.0)を使用した。

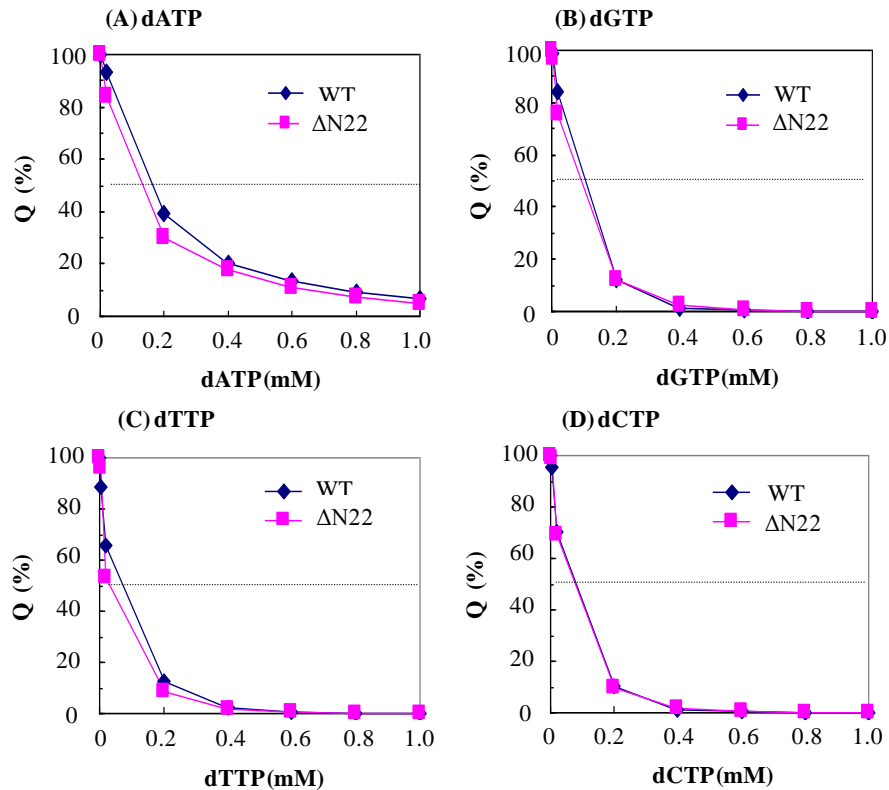


**Fig.5** *E.coli* zinT WT および  $\Delta N22$  の dNTP 存在下における Tyr 蛍光スペクトル

(A) dATP、(B) dGTP、(C) dTTP、(D) dCTP。図中の濃度は、添加した各ヌクレオチドの終濃度を示す。測定条件は以下の通り行なった。タンパク質濃度:0.05mg/mL、励起波長:275nm、蛍光測定波長:300-400nm。Buffer はいずれも 20mM Tris-HCl (pH 8.0)を使用した。

が見られる<sup>3)</sup>。また、ヌクレオチド結合性タンパク質の分子内部に存在する Tyr 残基を指標として、ヌクレオチド存在下で蛍光スペクトルを測定すると、濃度に依存して蛍光強度が減少することが知られている<sup>13)</sup>。そこで、*E.coli* zinT のヌクレオチド結合性の可能性を検討するために、分子内に

存在する Tyr 残基 (13 残基) を指標として、Tyr 蛍光スペクトルのヌクレオチド添加に伴うスペクトル変化を、WT および  $\Delta N22$  について検討した(Figs.5 and 6)。その結果、WT、 $\Delta N22$  とも dNTP 濃度に依存して Tyr 蛍光の減少を生じることが明らかとなった(Fig.5)。zinT の Tyr 蛍光の消光率の



**Fig.6** *E.coli zinT* WT および  $\Delta N22$  の Tyr 蛍光消光率の dNTP 濃度依存性  
(A) dATP、(B) dGTP、(C) dTTP、(D) dCTP.

ヌクレオチド濃度依存性(Fig.6)より、各ヌクレオチド添加による蛍光強度の減少は、 $dTTP > dCTP > dGTP > dATP$  の順に大きいことが示唆された。また、 $\Delta N22$  は若干 WT よりも消光しやすい傾向が見られたが、両者に顕著な差異は見られなかった。

以上の結果より、*zinT* の Tyr 残基は、ヌクレオチド添加により蛍光強度の減少が生じることから、分子内 Tyr 残基とヌクレオチドは近接しており、両者間の相互作用が可能であると考えられる。また、この *zinT* のヌクレオチド結合には、先の Walker motif A 類似配列を含む N 末端 22 残基の寄与は少ないと考えられる。

#### *E.coli zinT* WT および $\Delta N22$ の疎水性低分子結合実験(lipocalin 活性)

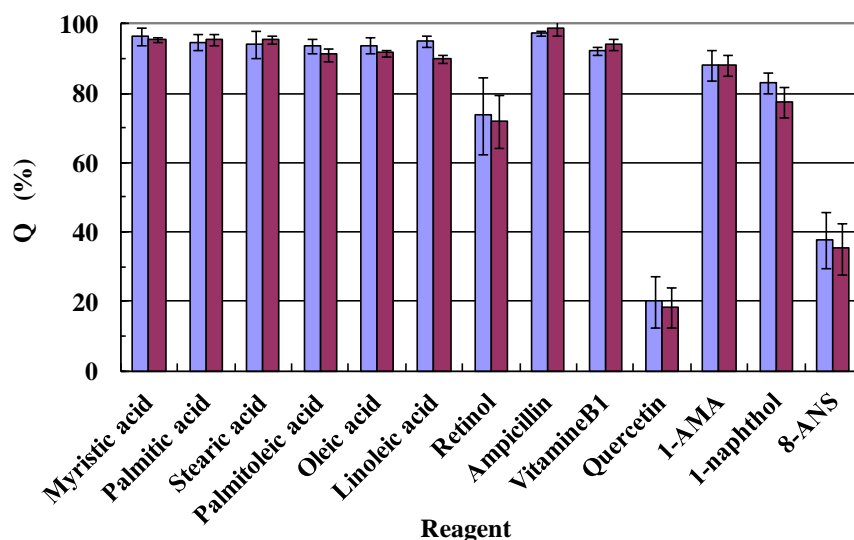
*E.coli zinT* は、Calycin/Lipocalin family と一次構造上相同な  $G^{37}XW^{39}$  を持ち、三次元立体構造においても同 family と類似した Calycin/Lipocalin-like domain を持つことが報告されている<sup>12)</sup>。しかし、*E.coli zinT* が疎水性低分子と結合する lipocalin 活性を持つという報告例はない。そこで、*E.coli zinT* の種々の低分子との結合能について、他の

lipocalin タンパク質の報告を参考に<sup>14-19)</sup>、実験方法に記載した条件で以下のように検討した。

まず、(1)脂肪酸・脂溶性分子として、飽和脂肪酸のミリスチン酸(C14:0)、パルミチン酸(C16:0)、ステアリン酸、不飽和脂肪酸のパルミトレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)、脂溶性分子としてレチノールの計 7 種(終濃度 30 $\mu$ M)を、(2)複素式化合物として、アンピシリン、ビタミン B1(チアミン塩酸塩)、ケルセチンの計 3 種(終濃度 30 $\mu$ M)を、(3)芳香族化合物として、1-ナフトール、8-ANS、1-AMA の 3 種(終濃度 30 $\mu$ M)をそれぞれ各 *zinT* に添加し、*zinT* 分子内に存在する Trp 残基 (3 残基) を指標として、Trp 蛍光スペクトルの変化を WT および  $\Delta N22$  について検討した(Fig.7)。

これより、(1)脂肪酸・脂溶性分子ではレチノールを添加した場合に、WT、 $\Delta N22$  とも Trp 蛍光強度の減少が見られた。また他の脂肪酸については、WT、 $\Delta N22$  とも蛍光強度の顕著な減少は観察されなかった。(2) 複素式化合物では、WT、 $\Delta N22$  ともケルセチン>ビタミン B1>アンピシリンの順に蛍光強度の減少が観察された。特にケルセチンは、WT、 $\Delta N22$  とも蛍光強度の大幅な減少が見られた。(3) 芳香族化合物では、WT、





**Fig.7** *E.coli* zinT WT および ΔN22 の疎水性低分子存在下における蛍光スペクトルの消光率

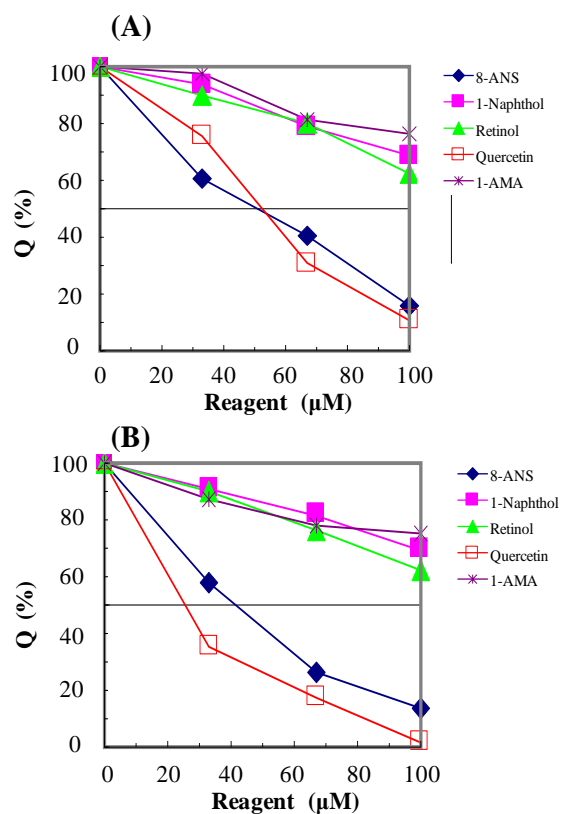
zinT タンパク質(0.02mg/mL, 1μM)に、各試薬を終濃度 30μM になるように添加し、zinT の Tyr 蛍光スペクトルの最大蛍光強度より消光率 Q を算出した。図中のバーは SD を示し、各 3 回の実験より算出した。

■: zinT WT、■: zinT ΔN22

ΔN22 と 8-ANS > 1-ナフトール > 1-AMA の順に蛍光強度の減少が観察された。特に 8-ANS と 1-ナフトールは、WT、ΔN22 とともに蛍光強度の大幅な減少が見られ、*E.coli* zinT の Trp 残基はこれらの疎水性分子と相互作用することが示唆された(Fig.7)。以上の結果より、ケルセチン、8-ANS、レチノール、1-ナフトール、1-AMA を添加した場合において、*E.coli* zinT の Trp 蛍光の減少(Q<90%)を導くことから、zinT はこれらの疎水性低分子と結合する機能(lipocalin 活性)を有することが明らかとなった。

#### 4. zinT の低分子結合の濃度依存性

さらに、Fig.7 で相対蛍光強度 Q が 90%以下に低下した試薬 (ケルセチン、8-ANS、レチノール、1-ナフトール、1-AMA) に対して、試薬の結合濃度依存性を検討した。各試薬の終濃度を 0, 33, 66, 100μM に設定し、上記と同様に Trp 蛍光スペクトルの変化を WT および ΔN22 について検討した(Fig.8)。これより検討した 5 種類の低分子は、いずれも濃度依存的に zinT の Trp 蛍光を消光させることが明らかとなった。また消光率の濃度依存性(Fig.8)より、特にケルセチンおよび 8-ANS で、WT、ΔN22 とともに蛍光強度の減少が顕著に見られ、終濃度 66-100μM では Q 値は 50%以下となった。また、各試薬に対する特異性は、WT と ΔN22 で顕著な差異は見られなかったが、ケルセチンのみ ΔN22 が WT よりも消光しやすい傾向が見られた



**Fig.8** *E.coli* zinT WT および ΔN22 の Tyr 蛍光消光率の疎水性低分子濃度依存性

(A) zinT WT、(B) zinT ΔN22. zinT タンパク質(0.02mg/mL, 1μM)に、各試薬を図中の終濃度になるように添加し、消光率 Q を算出した。

**Table II** *zinT* WT および  $\Delta$ N22 の各 ligand に対する  $K_d$  値

	$K_d,app(\mu M)$	
	WT	$\Delta$ N22
dATP	177	143
dTTP	59.3	47.7
dGTP	65.4	62.9
dCTP	58.5	60.1
8-ANS	32.1	35.4
1-AMA	170	142
Retinol	144	178
1-Naphthol	233	171
Quercetin	22.3	13.6

(Fig.8)。以上の *E.coli zinT* WT および  $\Delta$ N22 に対する低分子結合実験の結果から、各試薬に対する結合定数  $K_d$  値を算出したところ (Table II)、ヌクレオチドでは dCTP, dTTP, dGTP が、低分子では 8-ANS, ケルセチンが、それぞれ  $K_d$  値が小さく、いずれも  $\mu M$  オーダーで消光作用を示すことが明らかとなった。また WT と  $\Delta$ N22 を比較すると顕著な差異は見られないが、若干  $\Delta$ N22 がこれらの分子と相互作用しやすい傾向が見られた。よって、*E.coli zinT* はこれらの分子と相互作用が可能であり、*zinT* の Tyr 残基は dNTP と、Trp 残基は 8-ANS やケルセチンとそれぞれ近接しており、各芳香環に由来する蛍光強度を減少させていることが考えられる。また、N 末端 22 残基は、*zinT* の低分子結合能への関与は低いと推定される。

#### 4. 考察

緒言で述べたように、大腸菌ストレス応答タンパク質の一種である *zinT* は重金属やアミトロール(AT)で発現誘導され<sup>1,8,9)</sup>、一次構造比較や X 線結晶構造解析による三次元立体構造などから、ABC transporter や lipocalin ファミリーと一部相同なアミノ酸配列を持つことが明らかとなっている<sup>3)</sup>。*zinT* の機能については、金属以外の低分子結合能については報告がない。そこで本研究では、まず *E.coli zinT* の大量発現系の構築を行い、*zinTA* の蛋白質科学的特性や種々の物質との結合能を、野生型 *zinT* (WT)、N 末端 22 残基欠損体 ( $\Delta$ N22)を用いて検討した。

まず *zinT* の分子内 Tyr または Trp を内在性蛍光プローブとして、種々の物質を添加後、これらの蛍光スペクトルの消光を測定した。低分子化合物としては、(1)AT、イミダゾールおよび dNTP (2)脂肪酸および脂質 7 種、(3)複素式化合物 3 種、(4)芳香族化合物 3 種を検討し、*zinT* に対しそれ

ぞれ添加し、30°C、10 分間保温後、蛍光スペクトルを測定した。まず、(1) AT、イミダゾール (Fig.4)および dNTP (Figs.5 and 6)では、*zinT* の Tyr 蛍光が AT、イミダゾール、dNTP によりいずれも濃度依存的に減少した。AT による消光はイミダゾールよりも若干大きく、これらの化合物と Tyr 残基の相互作用が示唆されたが、化合物は *zinT* に比べ 1000 倍以上モル過剰であり、 $Q$  値も 50% 以下にならなかったこと (Fig.4)から、*zinT* とこれらの化合物の相互作用はかなり弱いものであると考えられる。一方、*zinT* の Tyr 残基は、ヌクレオチド添加により濃度依存的に蛍光強度の減少が生じた (Figs.5,6)。この結果では、dATP 以外のヌクレオチドは終濃度約 0.4mM で消光し、この時の *zinT* と dNTP のモル比は 1:160 であることから、先の AT やイミダゾールよりも親和性は高いことが明らかとなった。この場合には、分子内 Tyr 残基とヌクレオチドは近接しており、両者間の相互作用が可能であると考えられる。また、この *zinT* の N 末端領域にはヌクレオチド結合性タンパク質に見られる Walker motif A (GXXXXGKT/S)<sup>25)</sup> に類似した配列 (G<sup>2</sup>HSHGK<sup>9</sup>)が見られるが、このうち Gly2-Gly7 は先の三次元立体構造の原子座標が得られておらず、分子内でかなり flexible な領域であると推定される。他のヌクレオチド結合タンパク質の場合には、このモチーフ領域は loop 構造を取ることが多く見られるが、*zinT* の場合には N 末端にあり、 $\Delta$ N22 でも dNTP での消光は WT と同様に生じたことからこの配列の寄与は低いと考えられ、分子表面の他の領域が主に相互作用に関与している可能性がある。

次に *zinT* の疎水性低分子結合能 (lipocalin 活性) を検討した (Figs.7,8)。*E.coli zinT* は、Calycin/Lipocalin family と一次構造上相同な G<sup>37</sup>XW<sup>39</sup> を持ち、三次元立体構造においても同 family と類似した Calycin/Lipocalin-like domain を持つことが報告されている<sup>3)</sup>。しかし、*E.coli zinT* が疎水性低分子と結合する lipocalin 活性を持つという報告例はない。そこで、*E.coli zinT* の種々の低分子との結合能について検討した。まず、(2)脂肪酸および脂質 7 種、(3)複素式化合物 3 種、(4)芳香族化合物 3 種について終濃度 30 $\mu M$  で *zinT* の Trp 蛍光に対する消光作用を検討したところ (Fig.7)、レチノール、ケルセチン、AMA、1-ナフトール、8-ANS で分子内 Trp 蛍光の消光 ( $Q < 90\%$ ) が観察された。さらに、これらの化合物添加による *zinT* の蛍光スペクトルは濃度依存的に消光し (Fig.8)、特にケルセチンおよび 8-ANS でそれぞれ  $K_d$  値が小さく、いずれも  $\mu M$  オーダーで消光作用を示すことが明らかとなった (Table II)。この条件下では、*zinT* と化合物のモル比は 1:100 以下であることから、先の AT、イミダゾール、dNTP よりも親和性の高いことが明らかとなった。また WT

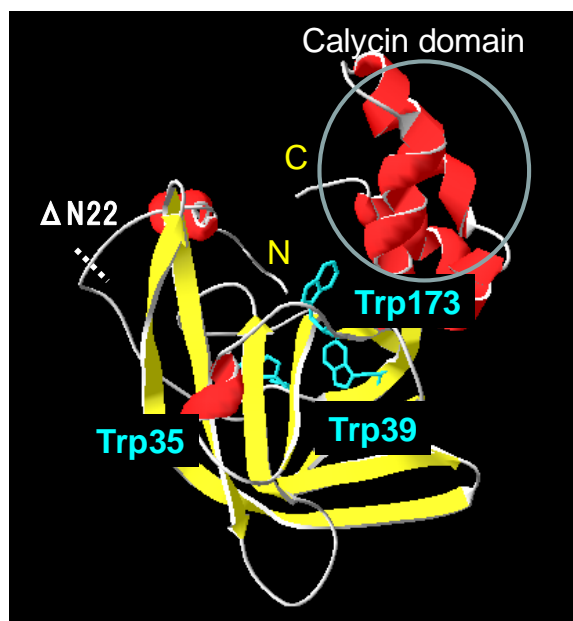


Fig.9 *E.coli* zinT タンパク質の三次元立体構造 (PDB:1OEJ)と Trp 残基の位置

と  $\Delta N22$  を比較すると顕著な差異は見られないが、若干  $\Delta N22$  がこれらの分子と相互作用しやすい傾向が見られた (Table II)。このことから zinT は疎水性低分子化合物結合能 (lipocalin 活性) を有し、zinT の Trp 残基は 8-ANS やケルセチンとそれぞれ近接しており、各芳香環に由来する蛍光強度を減少させていることが考えられる。また、N 末端 22 残基は、zinT の低分子結合能への関与は低いと推定される。この zinT の lipocalin 活性に寄与する Trp 残基として Trp35、Trp39、Trp173 の 3 残基が考えられるが、この点において我々は W173A 変異体を作成し、lipocalin 活性を検討したところ、Kd 値は若干上昇したものの、WT と同様に低分子化合物で消光が観察されたため、zinT の lipocalin 活性には残りの Trp 残基 (Trp35, 39) が主に関与している可能性が示唆されている (Sato, T *et al*, in preparation)。

以上の結果より、*E.coli* zinT タンパク質は低分子疎水性に親和性を示す lipocalin 活性を持つことが明らかとなり、N 末端 22 残基の寄与は少なく、分子内の Trp 残基を含む疎水性領域が主にこの機能に関与していると推定した。本研究で対象とした *E.coli* zinT は Cd, Zn, Ni と結合した三次元立体構造が 2003 年に報告され、これらの金属結合部位が明らかとなった<sup>3)</sup>。これより、zinT の Ni および Cd 結合には His144, His153, His155 が、Zn 結合には His144, His155 および His153, Glu189, His193 がそれぞれ配位子となっており、他の lipocalin family のタンパク質と異なり、この金属結合が  $\beta$ -barrel に存在する Trp 残基を含む疎水性

領域を溶媒から遮蔽し、疎水性低分子との結合を妨げると推定されている<sup>3)</sup>。しかし、分子内部に存在する Trp や Tyr 残基は、dNTP や疎水性低分子との相互作用により消光作用を受けることが本研究から明らかとなった。そこで、本研究で用いた低分子化合物の特性から、さらに考察を加える。

Fig.9 に示した zinT の三次元立体構造において、先の金属結合部位は  $\alpha 1$  および  $3_{10}$ -helix の N 末端領域と、分子中央の  $\alpha 2, 3, 4$  および C 末端の  $\alpha 6$  の領域に挟まれる形 (Calycin domain) で存在している。この領域の cavity は、約 10-15 Å の幅を持ち、先の金属結合部位は主に calycin domain に存在している。本研究で検討した低分子の分子長 (長軸方向) は、レチノールで約 16 Å、ケルセチンや 8-ANS で約 10 Å、1-AMA で約 8 Å、1-ナフトールで約 5.5 Å である。これを得られた Kd 値 (Table II) と比較すると、約 10 Å のケルセチンや 8-ANS が最小となり、zinT 分子内の cavity に適切な分子長であると考えられる。このことから、zinT の疎水性低分子結合能には、リガンド分子の疎水性や分子長が影響を与えると考えられる。本研究で見られたこれら低分子による分子内芳香環の蛍光消光機構については、今後詳細な研究が必要である。

## 参考文献

1. Ferienc, P., Farewell, A., Nyström, T. (1998) The cadmium-stress stimulation of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, **144**, 1045-1050.
2. Puskarova, A., Ferienc, P., Kormanec, J., Homerova, D., Farewell, A., and Nystrom, T. (2002) Regulation of yodA encoding a novel cadmium-induced protein in *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**, 3801-3811
3. David, G., Blondeau, K., Schiltz, M., Penel, S., Bentley, A.L. (2003) YodA from *Escherichia coli* is a Metal-binding, Lipocalin-like Protein. *J. Biol.Chem.*, **278**, 44, 43728-43735
4. Stojnev, T., Harichov, J., Ferienc, P., Nystrom, T. (2007) Function of a Novel Cadmium-Induced YodA Protein in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, **55**, 99-104
5. Kershaw, C.J., Brown, N.L. and Hobman, J.L. (2007) Zinc dependence of zinT (yodA) mutants and binding of zinc, cadmium and mercury by zin T. *Biochem. Biophys. Acta.*, **364**, 66-71
6. Pribyl, J., Herzel, F., Schmidt, G. (1978) Beitrag zur Rückstandsanalytik des Aminotriazols. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **289**, 81-85
7. Bamford, D., Sorsa, M., Gripenberg, U., Laamanen, I., Meretoja, T. (1976)

- MUTAGENICITY AND TOXICITY OF AMITROLE. III. MICROBIAL TESTS. *Mutation Research*, 197, 197-202
8. Toone, W.M., Rudd, K.E., Friesen, J.D.(1992) Mutations Causing Aminotriazole Resistance and Temperature Sensitivity Reside in gyrB, Which Encodes the B Subunit of DNA Gyrase. *Journal of Bacteriology*, **174**, 5479-5481
9. Rudd, K.E., Bochner, B.R., Cashel, M., Roth, J.R.(1985) Mutations in the spoT Gene of Salmonella typhimurium : Effects on his Operon Expression. *Journal of Bacteriology*, **163**, 534-542
10. Yamaguchi, Y., Miyano-Ono, M., Kyogoku-Tsujinaka, H., Yamaguchi, Y., Aoki, T., Satoh, T. (2013) Protein Expression Analysis in Amitrole-Resistant *E.coli* Strains, *Natural Science Research*, **27**, 4, 83-90
11. Birch, R.M., O'Byrne, C., Booth, I.R., Cash, P. (2003) Enrichment of *Escherichia coli* proteins by column chromatography on reactive dye columns. *Proteomics*, **3**, 764-776
12. Kannan, G., Wilks, J.C., Fitzgerald, D.M., Jones, B.D., BonDurant, S.S. and Slonczewski, J.L. (2008) Rapid acid treatment of *Escherichia coli*: transcriptomic response and recovery. *BMC Microbiology*, **8**, 37, 1-13
13. Okajima, T., Tanizawa, K., Yoneya, T. and Fukui, T. (1991) Role of Leucine 66 in the Asymmetric Recognition of Substrates in Chicken Muscle Adenylate Kinase. *J.Biol.Chem.*, **266**, 18, 11442-11447
14. Campanacci, V., Bishop, R.E., Blangy, S., Tegoni, M., Cambillau, C. (2006) The membrane bound bacterial lipocalin Blc is a functional dimmer with binding preference for lysophospholipids. *FEBS Lett.* **580**, 4877-4883
15. Suire, S., Stewart, F., Beauchamp, J., Kennedy, M.W. (2001) Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. *Biochem.J.* **356**, 369-376.
16. Muresan, S., Bent, A., Wolf, F.A. (2001) Interaction of  $\alpha$ -Lactoglobulin with Small Hydrophobic Ligands As Monitored by Fluorometry and Equilibrium Dialysis: Nonlinear Quenching Effects Related to Protein-Protein Association. *J. Agric. Food. Chem.*, **49**, 2609-2618
17. Breustedt, D.A., Schönfeld, D.L., Skerra, A. (2006) Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochem. Biophys. Acta*, **1764**, 161-173
18. Gasymov, O.K., Abduragimov, A.R., Yusifov, T.N., Glasgow, B.J. (2002) Relaxation of  $\beta$ -Structure in Tear Lipocalin and Enhancement of Retinoid Binding. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **43**, 10, 3165-3173
19. Campanacci, V., Krieger, J., Bette, S., Sturgis, J.N., Lartigue, A., Cambillau, C., Breer, H., Tegoni, M. (2001) Revisiting the Specificity of *Mamestra brassicae* and *Antheraea polyphemus* Pheromone-binding Proteins with a Fluorescence Binding Assay. *J.Biol.Chem.*, **276**, 20078-20084.
20. Lawton, P., Pélandakis, M., Pétavy, A.F., Walchshofer, N. (2007) Overexpression, purification and characterization of a hexahistidine-tagged recombinant extended nucleotide-binding domain 1 (NBD1) of the *Cryptosporidium parvum* CpABC3 for rational drug design. *Mol.Biochem.Prasitol.*, **152**, 101-107.
21. Tomečková, V., Guzy, J., Kušnír, J., Fodor, K., Mareková, M., Chavková, Z., Perjési, P. (2006) Comparison of the effects of selected chalcones, dihydrochalcones and some cyclic flavonoids on mitochondrial outer membrane determined by fluorescence spectroscopy. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **69**, 143-150
22. Ruiz, J.L. Ferrer, J., Pire, C., Llorca, F.I. and Bonete, M.J. (2003) Denaturation studies by fluorescence and quenching of thermophilic protein NAD<sup>+</sup>-Glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8. *J.Prot.Chem*, **22**, 295-301
23. Hung, H.C. and Chang, G.G. (2001) Multiple unfolding intermediates of human placental alkaline phosphatase in equilibrium urea denaturation. *Biophysical Journal* **81**, 3456-3471
24. Musi, V., Spolaore, B., Picotti, P., Zamboni, M., De Filippis, V. and Fontana, A. (2004) Nicked Apomyoglobin: A Noncovalent Complex of Two Polypeptide Fragments Comprising the Entire Protein Chain. *Biochemistry*, **43**, 6230-6240
25. Ramakrishnan, C., Dani, V.S. and Ramasarma, T. (2002) A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins. *Protein Engineering*, **15**, 10, 783-798.

青木拓、武智佳代、後河内(前村)知美、半野由依子、酒井勇太、伊藤寛人、広瀬(柴垣)明佳、佐藤高則

論文受付：2015 年 10 月 2 日

論文受理：2015 年 10 月 15 日